



УДК 616.153.915-074:616.12-005.4+616.379-008.64

СПОСОБЫ ТЕСТИРОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭТИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

**Ю.А. ПАНАСЕНКОВА
Е.И. РЕМЕНЯКИНА
В.Д. ЛЕВИЧКИН
А.А. БАСОВ
И.И. ПАВЛЮЧЕНКО**

*ГБОУ ВПО «Кубанский
Государственный
медицинский
университет
Минздрава России»*

e-mail: vochka@rambler.ru

В статье изложены данные о возможных про- и антиоксидантных свойствах препаратов, используемых в пульмонологической практике в комплексной терапии ХОБЛ: АЦЦ, лазолван, гепарин, клексан в тест-системах *invitro* и *exvivo*. В настоящем исследовании антиоксидантной активности фармпрепаратов была использована люминол-зависимая H_2O_2 -индуцированная хемилюминесценция (ХЛ), которая проводилась на хемилюминотестере ЛТ-1 производства НПО «Люмин» (г. Ростов-на-Дону) по авторской методике [7]. При исследовании антирадикальной и антиоксидантной активности фармпрепаратов проводилось определение следующих показателей ХЛ: максимума быстрой вспышки ХЛ (МВХЛ) в сравнении с эталоном ($h_{\text{хем}}$, %) и площади быстрой вспышки ХЛ (ПВХЛ) за 25 секунд в сравнении с эталоном ($S_{25\text{хем}}$, %). Одновременно с ХЛ использовался амперометрический метод определения антиоксидантной активности (АОА), заключающийся в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала, регистрируемого при помощи аппарата Яуза-ААА-01, с калибровочным стандартом, например аскорбиновой кислотой, измеренного в тех же условиях [11]. На основании полученных результатов, с учетом данных литературы и стандартов лечения ХОБЛ, можно сделать следующее заключение: при необходимости смены антикоагулянтов в терапии больных с ХОБЛ (переходе с гепарина на клексан) не требуется назначение дополнительных антиоксидантных средств в случае одновременного применения у них в качестве отхаркивающего средства АЦЦ, в тоже время при использовании у них в качестве отхаркивающей терапии лазолвана целесообразно дополнительное применение в их комплексной терапии антиоксидантов прямого действия. Длительное использование в качестве отхаркивающего средства лазолвана способно понижать антиокислительную емкость плазмы крови, поэтому целесообразна его периодическая замена с учетом клинической картины заболевания.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, люминол-зависимая H_2O_2 -индуцированная хемилюминесценция, антиокислительный потенциал, ХОБЛ, лазолван, гепарин, АЦЦ.

Все большее значение во всем мире (США, ведущие страны Европы, Япония, Китай и другие), помимо диагностики окислительного стресса (ОС), приобретают вопросы по его профилактике и эффективной коррекции нарушенного гомеостаза в результате его патофизиологических проявлений. Для этих целей используются как природные, так и синтетические антиоксиданты различной химической природы, которые подразделяются на антиоксиданты косвенного (опосредованного) действия и антиоксиданты прямого (направленного) действия.

Антиоксиданты косвенного действия способны снижать интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) только в биологических объектах (от клеточных органелл до целого организма), так как механизм их действия связан с влиянием на метаболические процессы, обеспечивающие баланс про-/антиоксиданты в условиях целостного организма, в связи с чем их антиоксидантные свойства *invitro* не могут реализовываться, так как разрываются метаболические пути. Механизмы их антиоксидантного действия *invivo* различны: активация (реактивация) антиоксидантных ферментов; подавление в организме реакций, приводящих к образованию АФК; сдвиг реакций СРО в сторону образования менее реакционноспособных соединений; селективная индукция генов, кодирующих белки АОС и репарации повреждений; нормализация обмена веществ и т.д. Нормализация тех или иных обменных процессов в организме способствует поддержанию гомеостаза, в условиях которого скорость протекания реакций СРО поддерживается на физиологическом уровне. Таким образом, любое вещество, нормализующее



метаболические процессы в организме, способно на уровне организма проявить «антиоксидантный» эффект [1].

Антиоксиданты прямого действия оказывают непосредственное антирадикальное действие, которое можно обнаружить *invitro*, используя специальные тест-системы. Большую часть используемых лекарственных препаратов с антиоксидантным действием составляют вещества прямого действия. В медицинской и фармацевтической практике наиболее перспективными являются разработка и использование средств с направленной и установленной в определенных единицах АОА. Выделяют антиоксиданты природного (растительного и животного) происхождения и синтетические соединения, что определяет себестоимость получаемых из них препаратов. Первичный скрининг таких антиоксидантных средств можно эффективно проводить *invitro* с использованием относительно простых тест-систем, которые разработаны и широко используются в лабораторной практике [2, 3, 4, 5]. Этот подход оправдан тем, что эффективность антиоксидантов прямого действия мало зависит от функционального состояния метаболических систем организма. Использование тест-систем позволяет изучать АОА различных фармпрепаратов и БАД в связи с невозможностью, в большинстве случаев, достоверного мониторинга их антиоксидантных свойств в биологических средах *invivo*.

Особенности антиоксидантного действия веществ определяются в первую очередь их химической природой, что необходимо учитывать при разработке новых эффективных антиоксидантных препаратов и БАД. Общепринятой классификации антиоксидантов прямого действия до настоящего времени не разработано, хотя существует несколько методических подходов, используемых для решения этой задачи.

Один из таких подходов основывается на классификации антиоксидантов по их растворимости в водной и липидной фазе, что позволяет выделить две группы АО: гидрофильные (например, аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, цистеин и др.), липофильные (например, токоферолы, ретинол и др.) [6], амфифильные (убихинол, липоевая кислота, тиронины, серосодержащие и циклические аминокислоты и др. [6]. Эта классификация позволяет оценить, в каких (липидных или водных) компартментах организма преимущественно будет концентрироваться и соответственно эффективно действовать то или иное вещество и на какие субстраты свободнорадикального окисления они могут воздействовать. Однако эта классификация не позволяет группировать АО по механизму их действия.

Другим методическим подходом при разработке классификации антиоксидантов является деление по направленности их действия на конкретные вещества прооксидантной природы (АФК, нерадикальные инициаторы СРО, радикалы – промежуточные продукты СРО и т.д.). Эта классификация, по мнению автора [1] не всегда пригодна для использования в целях поиска новых антиоксидантных веществ, поскольку не учитывает химической структуры соединений и, следовательно, при скрининге антиоксиданта с определенным химическим строением не позволяет аргументированно предсказывать наличие у них антиоксидантных свойств и прогнозировать их эффективность.

Учет связи между химической структурой и мишенями действия АО является, на наш взгляд, необходимой предпосылкой для целенаправленного поиска новых АО с определенными мишенями действия и заранее заданными свойствами для наиболее эффективного лечения конкретных заболеваний, ключевую роль в развитии которых играют те или иные звенья СРО. При этом очень важными являются данные по сравнительному исследованию АОА не только антиоксидантов направленного действия, но и медикаментозных средств, которые могут тем или иным образом сдвигать баланс в системе про-/антиоксиданты при их использовании в клинической практике при заболеваниях, которые предопределяют наличие оксидативного напряжения в организме пациента (заболевания дыхательной, сердечно-сосудистой, эндокринной и иммунной систем и др. «свободнорадикальные» патологии).

Наиболее приемлемыми для изучения антиоксидантов являются биофизические методики с индукцией свободнорадикальных процессов и хемилюминесцентной регистрацией или фотометрическим определением промежуточных (например, ДК) и конечных продуктов реакции (например, МДА).

Цель – изучение возможных про- или антиоксидантных свойств препаратов, используемых в пульмонологической практике в комплексной терапии ХОБЛ: АЦЦ, лазолван, гепарин, клексан в тест-системах – *invitro* и – *exvivo*.

Материалы и методы. В настоящем исследовании антиоксидантной активности фармпрепаратов была использована люминол-зависимая H_2O_2 -индуцированная хемилюминесценция (ХЛ), которая проводилась на хемилюминесцентном ЛТ-1 производства НПО «Люмин» (г. Ростов-на-Дону) по авторской методике [7].

Изучение динамики процесса ХЛ [10] производилось с помощью собственного аппаратно-программного комплекса [7] с программным обеспечением [7], позволяющим оцифровывать



вать аналоговый сигнал с выхода хемилуминотестера ЛТ-1. Система для оценки состояния баланса в системе про- /антиоксиданты, содержащая хемилуминотестер ЛТ-1, позволяет проводить определение максимальной амплитуды вспышки ХЛ, площади затухания вспышки ХЛ. При исследовании антирадикальной и антиоксидантной активности фармпрепаратов проводилось определение следующих показателей ХЛ: максимума быстрой вспышки ХЛ (МВХЛ) в сравнении с эталоном ($h_{\text{хем}}$, %) и площади быстрой вспышки ХЛ (ПВХЛ) за 25 секунд в сравнении с эталоном ($S_{25\text{хем}}$, %). В обоих случаях эталоном служила реакционная смесь без биологического образца, но в присутствии активатора СРО – люминола. Про-, антиоксидантная способность исследуемых растворов определяется как процент ингибирования или активации индуцированных реакций СРО с участием люминола. При этом МВХЛ отражает наличие антиокислительных компонентов в исследуемом образце, а ПВХЛ указывает на их суммарные ресурсы.

Определение модулирующего влияния на антиоксидантный потенциал биологических жидкостей исследуемых лекарственных средств производили в тест-системах с кровью *ex vivo* после инкубации растворов фармпрепаратов в кровь или при добавлении исследуемых препаратов в соизмеримых концентрациях в тест-систему с плазмой крови пациентов, страдающих ХОБЛ. После инкубации или при смешивании с плазмой определенного фармпрепарата или их комбинации определялись выше описанные показатели ХЛ. Исследование влияния тестируемых фармпрепаратов на индуцированные процессы СРО проводили в авторских тест-системах, оценивая их антиперекисный потенциал на основании степени ингибирования процессов перекисного окисления, предварительно индуцированных путем внесения в тест-систему Fe^{2+} и перекиси водорода [4]. Антиокислительную активность выражали в убикиноновых единицах ($\text{Q-ED} = 13 \cdot 10^{-5} \text{ мг/мл vitQ}$). Одновременно с ХЛ использовался амперометрический метод определения антиоксидантной активности (АОА), заключающийся в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества (или смеси веществ) на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале и сравнении полученного сигнала, регистрируемого при помощи аппарата Яуза-ААА-01, с калибровочным стандартом, например аскорбиновой кислотой, измеренного в тех же условиях [11]. Величина возможной антиоксидантной активности фармпрепарата в чистом виде зависит от его химической природы, а при смешивании с кровью от его модулирующего влияния на антиоксидантный потенциал биологической жидкости. Калибровка по аскорбиновой кислоте проводится с использованием: фармакопейного раствора витамина С (100 мкл аскорбиновой кислоты развести элюентом 9,9 мл, затем приготовить растворы с концентрацией vitC 0,5 мг/л – 1,0 мг – 2,0 мг – 4,0 мг – 6,0 мг – 8,0 мг развести в 5 мл элюента и далее оценить АОА потенциал на Яуза –ААА-01 (рис. 1).

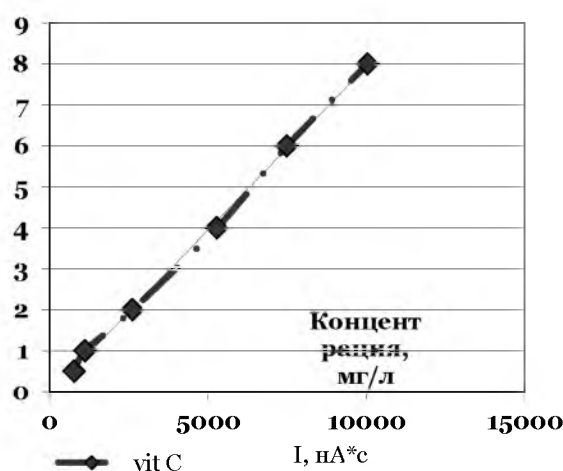


Рис. 1. Калибровочный график антиоксидантной активности по витамину С

Результаты. В итоге проведенных исследований получены результаты, которые свидетельствуют о том, что антиоксидантные свойства присущи только известным антиоксидантам, в частности препарату, в основе которого лежит ацетилцистеин (табл. 1). Лазолван практически не проявляет *invitro* своих антиоксидантных свойств – не снижает максимальную вспышку ХЛ и лишь незначительно способен уменьшать площадь ХЛ, в то время как АЦЦ *invitro* практически полностью гасит МВХЛ и ПВХЛ. При комбинировании *invitro* лазолвана и клексана их антиоксидантные свойства взаимно снижаются, в то время как гепарин практически не влияет на эффекты лазолвана. При комбинировании *invitro* АЦЦ с



гепарином и клексаном его антиоксидантные свойства практически не уменьшаются (несколько хуже с клексаном). При инкубации с кровью лазолван проявляет свои прооксидантные свойства, которые усиливаются при его комбинировании с клексаном и в большей степени с гепарином, особенно для МВХЛ. При инкубации с кровью АЦЦ сохраняет свои антиоксидантные свойства, при этом он способен нивелировать прооксидантные эффекты как гепарина, так и клексана практически в равной степени для МВХЛ и ПХЛ.

Таблица 1

Показатели ХЛ в присутствии тестируемых лекарственных средств

№	Лекарственные средства	%-МВХЛ	%-ПХЛ	Контроль
1	Лазолван in vitro	-0,94	-37,53	Люминол = 0,0 (100%)
2	АЦЦ in vitro	-99,91	-99,96	Люминол = 0,0 (100%)
3	Лазолван+гепарин in vitro	-0,47	-47,81	Люминол = 0,0 (100%)
4	Лазолван+клексан in vitro	+1,89	-23,56	Люминол = 0,0 (100%)
5	АЦЦ+гепарин in vitro	-98,11	-99,96	Люминол = 0,0 (100%)
6	АЦЦ+клексан in vitro	-97,56	-99,94	Люминол = 0,0 (100%)
7	Лазолван+кровь	+93,65	+97,30	плазма=0,0 (100%)
8	АЦЦ+кровь	-48,16	-36,29	плазма=0,0 (100%)
9	Лазолван+гепарин+кровь	+163,64	+161,27	плазма=0,0 (100%)
10	Лазолван+клексан+кровь	+117,67	+113,77	плазма=0,0 (100%)
11	АЦЦ+гепарин+кровь	-39,72	-36,68	плазма=0,0 (100%)
12	АЦЦ+клексан+кровь	-34,81	-33,57	плазма=0,0 (100%)

При анализе амперометрических данных получены аналогичные данные по выраженности антиоксидантного эффекта, прежде всего у АЦЦ (табл.2). В модельных тест-системах с кровью лазолван практически не проявляет своих антиоксидантных свойств, в то время как АЦЦ превосходит лазолван по антиокислительному потенциалу более чем в 2 раза (на 113,6%), при этом АЦЦ способен как самостоятельно повышать, после инкубации с кровью антиокислительную емкость плазмы, так и в комбинации с гепарином (на 15,7%) и в меньшей степени с клексаном (на 11,0%). При введении АЦЦ в модельные тест-системы с водно-спиртовой масляной смесью, в которой индуцированы внешними инициаторами СРО процессы ПОЛ, отмечается существенный эффект снижения перекисного окисления (на 2,69-6,22 убикиноновые единицы).

Таблица 2

Амперометрические показатели АОО тестируемых лекарственных средств

№	Лекарственные средства	АОА в мг/л вит С	Контроль	АОА H ₂ O ₂ /Fe ²⁺	АОА УФО/Fe ²⁺
1	Лазолван in vitro	5,510	элюент = 0,0	0,22	0,07
2	АЦЦ in vitro	11,772	элюент = 0,0	6,22	2,69
3	Лазолван+плазма	4,690	плазма (-24,9%)		
4	Лазолван+гепарин+плазма	5,268	плазма (-15,8%)	-	-
5	Лазолван+клексан+плазма	5,195	плазма (-16,9%)	-	-
6	АЦЦ+плазма	8,419	плазма (+34,6%)		
7	АЦЦ+гепарин+плазма	7,235	плазма (+15,7%)	-	-
8	АЦЦ+клексан+плазма	6,941	плазма (+11,0%)		

Выводы. На основании полученных результатов, с учетом данных литературы и стандартов лечения ХОБЛ, можно сделать следующее заключение:

1) при необходимости смены антикоагулянтов в терапии больных с ХОБЛ (переходе с гепарина на клексан) не требуется назначение дополнительных антиоксидантных средств в случае одновременного применения у них в качестве отхаркивающего средства АЦЦ, в то же время при использовании у них в качестве отхаркивающей терапии лазолвана целесообразно дополнительное применение в их комплексной терапии антиоксидантов прямого действия.

2) длительное использование в качестве отхаркивающего средства лазолвана способно понижать антиокислительную емкость плазмы крови, поэтому целесообразна его периодическая замена с учетом клинической картины заболевания (через 1-2 месяца) на АЦЦ, особенно у пациентов, получающих в качестве антикоагулянтов низкомолекулярные гепарины, в частности клексан.



Литература

1. Зайцев, В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антидотов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И.Закревский // Эксперим. и клин. фармакология. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 66-70.
2. Котеров, А.Н. Ингибирование металлотиионеином Fe^{2+} -индуцированного перекисного окисления липидов в липопротеинах яичного желтка // Биохимия. – 1997. – Т. 62, вып. 2. – С. 164-166.
3. Козлова, З.Г. Количественная оценка антиоксидантов в биологически активных добавках с помощью модельной реакции инициированного окисления кумола / З.Г. Козлова, В.Ф. Цепалов // Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека : материалы конф. – Смоленск, 2001. – С. 9-10.
4. Павлюченко, И.И. Способ диагностики антиокислительной активности лечебных и профилактических антиоксидантных средств / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов : пат. на изобретение № 2182706 ; заявл. 15.01.2001 ; опубл. 20.05.2002, Бюл. № 14.
5. Тихазе, А.К. Триметазидин как антиоксидант непрямого действия / А.К. Тихазе, В.З. Ланкин, Е.А. Жарова, С.В. Колычева // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – Т. 130, № 10. – С. 395-398.
6. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.
7. Павлюченко, И.И. Окислительный стресс, его мониторинг и критериооценки антиокислительной активности лекарственных препаратов и БАД : автореф. дис. д-ра мед. наук / И.И. Павлюченко. – Ростов н/Д, 2005. – 44 с.
8. Павлюченко, И.И. Система лабораторной диагностики окислительного стресса / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов : пат. на полезную модель № 54787 ; заявл. 19.01.2006 ; опубл. 27.07.2006, Бюл. № 21.
9. Павлюченко, И.И. Программарегистрации сигналов хемилуминоестера ЛТ-1 / И.И. Павлюченко, А.А. Басов, С.Р. Федосов : свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2006611562 ; заявл. № 2006610783 от 16.03.2006.
10. Федосов, С.Р. Способ повышения информативности прибора «Хемилуминоестер ЛТ-1» / С.Р. Федосов, И.И. Павлюченко, А.А. Басов // Современ. проблемы науки и образования. – 2006. – № 4, прил. № 1. – С. 27-28.
11. Басов, А.А. Современные способы стандартизации антиоксидантных лекарственных средств и биологически активных добавок / А.А. Басов, С.Р. Федосов, И.С. Канус [и др.] // Современ. проблемы науки и образования. – 2006. – № 4, прил. № 1. – С.149.

TESTING DRUGS METHODS OF ANTIOXIDANT PROPERTIES IN LABORATORY CONDITIONS AND THE POSSIBLE USE OF THESE INDICATORS IN CLINICAL PRACTICE

The article presents data on the possible pro-and antioxidant properties of the drugs used in pulmonology practice in the treatment of COPD: ACC, Mucosolvan, heparin, Clexane in test systems in vitro and ex vivo. In this study, the antioxidant activity of pharmaceuticals was used luminol-dependent H_2O_2 -induced chemiluminescence (CL), which was held on hemiluminotestere LT-1 of the NGO «Lumina» (Rostov-on-Don), the authors' methodology [7]. In the study of the antiradical and antioxidant activity of pharmaceuticals we measured the following indicators CL: quick flash of maximum CL (MVHL) compared with the standard (hhem%) and area quick flash CL (PVHL) for 25 seconds compared to the standard (S25hem%). Along with the CL used amperometric method for the determination of antioxidant activity (AOA), which consists in measuring the electric current arising in the oxidation of the substance (or mixture of substances) on the surface of the working electrode at a certain capacity and then comparing the signal detected by the device Jauza-AAA-01 with a calibration standard, such as ascorbic acid, measured under the same conditions [11]. Based on these results, the literature data and standard medical management can make the following conclusion: the need to change the anticoagulant therapy in patients with COPD (switching from heparin to Clexane) does not require the appointment of additional antioxidants in the case of simultaneous use them as an expectorant ACC, at the same time using them as extraordinary Mucosolvan appropriate additional therapy used in the treatment of the direct action of antioxidants. Long-term use as an expectorant Mucosolvan can lower antioxidant capacity of blood plasma, so it is suitable periodic replacement with the clinical picture of the disease.

Key words: antioxidant activity, lipid peroxidation, luminol-dependent H_2O_2 -induced chemiluminescence, antioxidant capacity, COPD, Mucosolvan, heparin, ACC.

Yu.A. PANASENKOVA¹
E.I. REMENYAKINA²
V.D. LEVICHKIN³
A.A. BASOV⁴
I.I. PAVLUCHENKO⁵

Kuban State Medical University

e-mail: vochka@rambler.ru